**Micropropagação da Cultivar CNPA Ita
90 II do Algodoeiro Via Embriogênese
Somática Indireta**Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹Marina Medeiros de A. Silva²Maria Jaislanny L. e Medeiros²Roseane Cavalcanti dos Santos³

O cultivo in vitro é de fundamental importância para o desenvolvimento da Biotecnologia que, na atualidade, tem rápida evolução. Willadino e Câmara (2005) mencionam que esta técnica tem várias aplicações práticas utilizadas amplamente na agricultura, dentre as quais se destacam a clonagem de vegetais, o melhoramento genético e a produção de mudas sadias.

Dentro da cultura de tecidos, a micropropagação é a modalidade que mais se tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas, constituindo-se em um modo de manterem-se, sempre disponíveis, explantes sadios e livres de contaminação para aplicação de técnicas de regeneração e transformação genética (CABRAL et al., 2003). No algodoeiro, a técnica de micropropagação pode ser empregada para conservação de germoplasma, multiplicação de novas cultivares, produção de clones - para sua avaliação contra doenças e pragas - e para propagar linhas androestéreis (CARVALHO et al., 1999).

Conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida

por uma dessas três maneiras: multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares; multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese ou multiplicação via embriogênese somática (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Barros (1999) afirma que a embriogênese somática é o processo pelo qual células ou tecidos somáticos (não sexuais) se desenvolvem até a formação completa de uma planta, através de uma série de estágios, característicos do desenvolvimento de embriões zigóticos. Os embriões somáticos podem ser obtidos por via direta (regeneração sem formação de calo) ou por via indireta (através da formação de calo, massa celular desorganizada).

A embriogênese somática é um importante método de multiplicação de plantas in vitro em larga escala, apresentando grande potencial a ser explorado, e capaz de maximizar a propagação de cultivares já recomendadas para plantio e vindas de programas de melhoramento (MACIEL, 2003); além disso, é uma técnica de grande aplicabilidade para os estudos básicos relacionados com a fisiologia, à

¹ Eng. Agrôn. Dr. da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, 58107-720 Campina Grande, PB. E-mail: julita@cnpa.embrapa.br

² Universidade Estadual da Paraíba, Estagiárias da Embrapa Algodão. e-mail: marinamedeirosas@yahoo.com.br; jaislanny@yahoo.com.br

³ Eng. Agrôn. D.Sc. da Embrapa Algodão. E-mail: caval@cnpa.embrapa.br

genética e à bioquímica do desenvolvimento embrionário (YEUNG, 1995).

O objetivo deste trabalho foi induzir a formação de calos embriogênicos da cultivar CNPA ITA 90 II do algodão para a posterior obtenção de plantas regeneradas.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo de Tecidos da Embrapa Algodão, ambiente em que as sementes da cultivar CNPA ITA 90 II foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio adicionada de Tween 20 e cultivadas in vitro em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Após a formação da planta matriz, como fonte de explantes, foram utilizados segmentos de hipocótilo, que foram inoculados em placas de Petri contendo meios de indução de calos (ICG1 e ICG2), compostos de sais do meio MS acrescido de 10 mg.^{L⁻¹} de MgCl₂, 0,3 mg.^{L⁻¹} de tiamina, 30 g.^{L⁻¹} de glucose, solidificante Gelrite e diferentes concentrações dos reguladores de crescimento: 1) ANA (ácido naftaleno acético) + KIN (cinetina) - ICG1, e 2) ANA (ácido naftaleno acético) + 2,4-D (ácido diclorofenóxiacético) - ICG2; quatro semanas depois, os calos foram transferidos para os meios de proliferação (mesmo meio de indução, sem tiamina e com diferentes concentrações de reguladores de crescimento). Tanto após a indução quanto após a proliferação dos calos, realizou-se uma avaliação, observando-se coloração, textura e contaminação. Transcorridas mais quatro semanas, os calos foram separados do explante inicial e cultivados (1g por repetição) em diferentes meios de indução da embriogênese somática, sem adição de fitorreguladores, onde permaneceram sendo subcultivados e avaliados a cada quatro semanas.

Em todos os casos, a incubação foi feita em sala de crescimento mantida a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16h luz/8h de escuro e intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Em ambos os tratamentos utilizados, ocorreu formação de calos que apresentaram, visualmente, diferenças quanto à coloração, à textura, à presença de raízes e à contaminação; esses dados podem ser averiguados por meio das Tabelas 1 e 2, nas quais se apresentam as avaliações feitas durante a indução e proliferação, respectivamente.

Tabela 1. Percentagem de calos na cultivar CNPA ITA 90 II nos tratamentos de indução

Tipos de calo	Tratamentos (%)	
	ICG 1	ICG 2
Verde e friável	58,8	77,8
Verde, friável e com antocianina	28,3	13,9
Verde, friável e com raízes	7,8	
Friável, com antocianina e raízes	2,2	
Verde e duro	2,8	
Contaminados		8,3
Total	99,9	100,0

Tabela 2. Percentagem de calos na cultivar CNPA ITA 90 II nos tratamentos de proliferação

Tipos de calo	Tratamentos (%)	
	PCP1	PCP2
Verde e friável	45,6	51,1
Marrom e friável		41,7
Verde, friável e com antocianina	31,1	
Friável, com antocianina e raízes	8,3	
Verde e duro	11,7	
Verde e duro	1,1	8,3
Contaminados	2,2	7,2
Total	100,0	100,0

O cálculo da percentagem dos calos foi baseado no total de 180 explantes distribuídos em 20 placas de Petri.

Verifica-se, de acordo com a Tabela 1, que, na indução todos os tratamentos apresentaram bom desenvolvimento de calos friáveis e de coloração esverdeada, que são os mais propícios ao surgimento de embriões somáticos; pode-se observar, também, o surgimento de calos com raízes (Figura 1) no tratamento em que estavam presentes os fitorreguladores ANA e KIN.

Fez-se, após quatro semanas da proliferação, nova avaliação dos calos, podendo-se constatar, na Tabela 2, que ambos os tratamentos permaneceram com elevadas percentagens de calos verdes e friáveis (Figura 2). Pode-se averiguar ainda que muitos calos do meio PCP2 escureceram, apresentando coloração marrom.

Posteriormente à proliferação, os calos foram separados do explante inicial e transferidos para os meios de indução da embriogênese somática ou meios de rediferenciação (Figura 3), onde

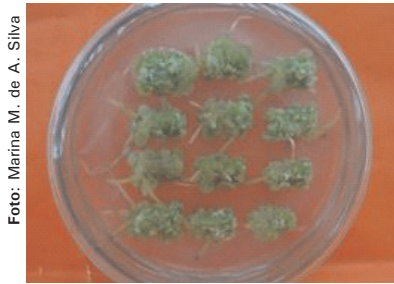


Foto: Marina M. de A. Silva

Fig. 1. Calos verdes, friáveis e com raízes no tratamento ICG 1

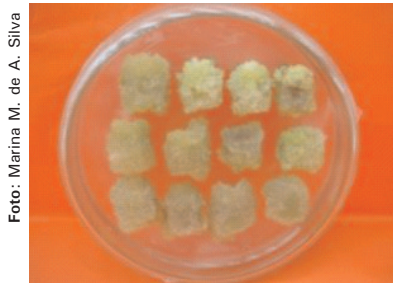


Foto: Marina M. de A. Silva

Fig. 2. Proliferação de calos verdes e friáveis

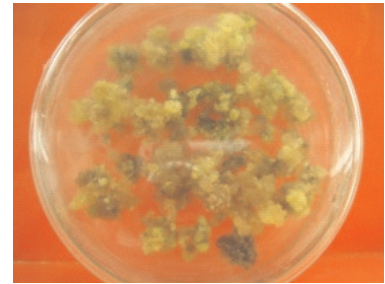


Foto: Marina M. de A. Silva

Fig. 3. Calos em meio de indução da embriogênese somática

permaneceram por quatro subcultivos, realizados a cada quatro semanas. Durante esses subcultivos, realizaram-se avaliações para verificar o surgimento de embrióides; entretanto, até o último subcultivo, os mesmos não foram originados.

Os maiores problemas para o êxito da biotecnologia aplicada ao algodão estão na dependência do genótipo e na baixa frequência de embriogênese somática, resultando na dificuldade da regeneração de tecidos transformados (TULI; KUMAR, 2004), porém muitos pesquisadores têm conseguido obter plantas regeneradas por meio desta técnica, como é o caso de Leelavathi et al. (2004), que regeneraram um elevado número de plantas de algodão transgênico a partir de calos embriogênicos, mediante a transformação por *Agrobacterium*. Carvalho et al. (1998), avaliando o comportamento das cultivares CNPA Precoces 2 e Coker 312, observaram a formação de embrióides, assim como Ganesan e Jayabalan (2005), que obtiveram sucesso na embriogênese somática da cultivar SVPR2, em meio MS suplementado com Picloran, cinetina e maltose.

Como o desenvolvimento desta técnica no algodão ainda é um procedimento limitado a poucas cultivares, torna-se necessário o estudo de outras variedades, pois o desenvolvimento de protocolos de cultura de tecidos para induzir uma proliferação eficiente em um genótipo independente, é um procedimento desejável para a transformação de genótipos desta espécie.

Os tratamentos utilizados apresentaram bom desenvolvimento de calos de coloração esverdeada e textura friável, observando-se que, nos ensaios de indução da embriogênese somática da cultivar

estudada não se verificou o surgimento de embrióides.

A regeneração de plantas não foi possível, devido ao não surgimento dos embriões somáticos.

Referências Bibliográficas

- BARROS, L. M. Embriogênese Somática. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**, Uberlândia, v. 2, n. 7, p. 36-39, 1999.
- CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L.; CARNEIRO, V. T. de C. **Introdução *in vitro*, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 101).
- CARVALHO, J. M. F. C.; BENITO, E. G.; PEREZ, C.; SANTOS, J. W. Respostas de duas cultivares de algodão à embriogênese somática em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**. Campina Grande, v. 2, n. 1, p. 13-19, 1998.
- CARVALHO, J. M. F. C.; MOREIRA, J. de A. N.; VIEIRA, R. de M. Cultivo *in vitro* do algodão. In: BELTRÃO, N. E. de M. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. v. 1, p. 405-418.
- GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Carbon source dependent somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton, *Gossypium hirsutum* L. c.v. SVPR2 through suspension cultures. **Indian Journal**

Experimental Biology, New Delhi, v. 43, n. 10, p. 921-925, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v. 1, Brasília, DF: Embrapa - SPI: Embrapa - CNPH, 1998. p. 183-241.

LEELAVATHI, S.; SUNNICHAN, V. G.; KUMRIA, R.; VIJAYKANTH, G. P.; BHATNAGAR, R. K.; REDDY, V. S. A simple and rapid Agrobacterium-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. **Plant Cell Reports**. New York, v. 7, p. 465-70, 2004.

MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A.R.; REZENDE, J. C. de; SILVA, A. B. da; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. CV. OBATÃ. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 107-116,

jan./fev., 2003. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/revista/27_1/art13.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

TULI, R.; KUMAR, M. Plant regeneration in cotton: a short-term inositol starvation promotes developmental synchrony in somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**. Columbia, v. 40, n. 3, p. 294-298, 2004.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>>. Acesso em: 16 out. 2005.

YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 205-247.

Comunicado Técnico, 342

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 500

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Nair Helena Castro Arriel
Secretária Executiva: Nivia Marta Soares Gomes
Membros: Demóstenes Marcos Pedroza de Azevêdo
Everaldo Paulo de Medeiros
Fábio Aquino de Albuquerque
Francisco das Chagas Vidal Neto
João Luiz da Silva Filho
José Wellington dos Santos
Luiz Paulo de Carvalho
Nelson Dias Suassuna

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia Marta Soares Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho